SUMMARY
Influence of freezing on bovin and equine sperm was studied. Is was established, that the most sensitive parts to low temperatures in bovin sperm are acrosomes.And in equine sperm the most sensitive parts to low temperatures are necks and tails.

УДК: 575. 224:599.323.4

Н.Ю. Сахарова, Л.М. Межевикина, Е.Ф. Вихлянцева, Т.В. Суханова, А.А. Смирнов, М.М. Поцелуева, В.С. Шубина, А.М. Малашенко
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт биофизики клетки РАН, Пущинский Государственный Университет, Научный центр биомедицинской технологии РАМН

ВЛИЯНИЕ ДМСО НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЗАРОДЫШЕЙ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ KIT^{W-Y} В УСЛОВИЯХ IN VITRO И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Мутация Dominant spotting (Kit^{W}) наиболее полно изучена на мышах, для которых известно более 70 ее аллелей. Большинство аллелей приводят к гибели гомозиготных особей. Гетерозиготные животные жизнеспособны, но у них изменена окраска шерсти, нарушены кроветворение и гаметогенез [1]. Фенотипические проявления мутации Kit^{W} у мышей связаны с нарушениями строения гена *c-kit*, расположенного в 5 хромосоме и кодирующего рецепторную тирозинкиназу [2, 3].

Одним из аллелей мутации Kit^{W}является аллель Kit^{W-Y}, обнаруженный у мышей линии C57BL/6 JY [4]. Изучение Kit^{W-Y} в гаметогенезе и в эмбриогенезе выявило частичный блок сперматогенеза на стадии диплотены, негативное влияние на дифференцировку мужских половых клеток, увеличение гибели яйцеклеток и эмбрионов на ранних стадиях развития [5]. Нарушения фертильности у мышей, несущих мутацию Kit^{W-Y}, делает их удобными моделями как для изучения механизмов регуляции внутриклеточных сигнальных процессов с использованием тирозинкиназных рецепторов, так и для изучения молекулярной генетики, биологии развития и репродукции млекопитающих [6]. Все это свидетельствует о необходимости сохранения гетерозиготных мышей Kit^{W-Y} для современных медико-биологических исследований, в том числе путем консервации их зародышей в генетических криобанках при температуре жидкого азота.

Процедура криоконсервации предусматривает работу с изолированными зародышами, а также использование специальных сред и криозащитных агентов, необходимых для поддержания сохранности объектов в жидком азоте и на этапе восстановления после размораживания. Целью наших исследований была оценка выживаемости мутантных зародышей мыши после криоконсервации и при действии криопротектора ДМСО. Культивирование и замораживание в жидком азоте проводили в стандартных условиях [7, 8].

В первой серии опытов было показано, что 2-клеточные зародыши, полученные от скрещивания гетерозиготных мышей B6 +/Kit^{W-Y} имеют более низкий потенциал

Таблица 1

Выживаемость 2-клеточных зародышей линии В6 с диким или мутантным геном Kit^{W-Y} после криоконсервации

Характеристики	B6 +/+		B6 +/Kit^{W-Y}	
	in vitro	-196° C	*in vitro*	-196° C
Количество зародышей	67	64	90	41
% развившихся до стадии бластоцисты	67,3*	60,9**	38,8*	45,4**

Примечание. В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО (Sigma).
* , ** - различия между двумя группами сравнения достоверны (P<0,01)

Таблица 2

Влияние ДМСО на выживаемость 2-клеточных зародышей мыши линии WR с диким и мутантным геном Kit $^{w-y}$ в условиях культивирования *in vitro*

Характеристики:	WR +/+		WR +/Kit $^{w-y}$	
	МСВ	1%ДМСО	МСВ	1%ДМСО
Количество зародышей	74	12	38	24
% развившихся бластоцист	64,9	75,0	73,7*	58,3*

Примечание. МСВ – модифицированная среда Виттена (7). * - достоверные различия (P<0,01)

развития до стадии бластоцисты, по сравнению с зародышами дикого типа В6 +/+ (табл. 1). Если присутствие аллеля Kit^{W-Y} в геноме мышей В6 снижает выживаемость мутантных зародышей *in vitro*, следует ожидать, что после замораживания-оттаивания сохранится лишь незначительная часть жизнеспособных зародышей с таким генотипом. Как показали наши исследования, их доля не превышает 45,4% (табл. 1). Следует иметь в виду, что среди этих жизнеспособных зародышей не все несут мутантный ген +/ Kit^{W-Y} на генотипе В6.

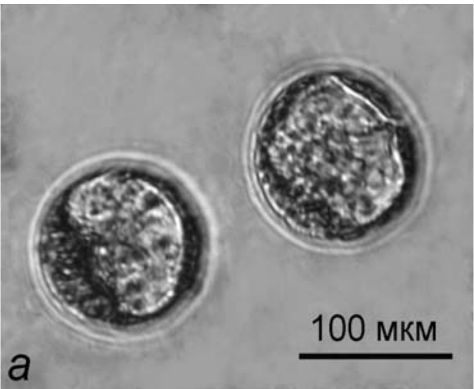
Известно, что фенотипические проявления многих мутаций зависят от основного генотипа особи [9, 10]. Поэтому во второй серии экспериментов мы исследовали мутацию Kit^{W-Y} на генотипе мышей линии WR, полученных от скрещивания самок линии 129/ReY с самцами линии В6, гетерозиготными по мутантному гену Kit^{W-Y} (НИЛ биомоделей РАМН, Светлые Горы). Линия 129 характеризуется склонностью к образованию тератом семенника и высокой радиорезистентностью [11]. Из бластоцист мышей 129 линии выделяют стабильные линии эмбриональных стволовых клеток [12].

Было показано, что 2-клеточные зародыши мышей WR, несущие дикий и мутантный ген Kit^{W-Y}, развиваются в культуре до стадии бластоцист примерно с одинаковой эффективностью (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния аллеля Kit^{W-Y} в генотипе WR на раннее развитие. Можно предположить, что в условиях *in vitro* относительное содержание мутантных зародышей, полученных от скрещивания гетерозиготных мышей WR +/ Kit^{W-Y}, будет выше, чем от скрещивания мышей линии В6 +/Kit^{W-Y}, и, следовательно, для сохранения мутации Kit^{W-Y} мыши линии WR будут более перспективными.

Мы оценили влияние криопротектора ДМСО на морфофункциональные характеристики мутантных зародышей линии WR. ДМСО использовали в концентрации 1 %, что на порядок ниже, чем при криоконсервации (табл. 2).

Оказалось, что даже при такой низкой концентрации ДМСО подавляет развитие 2-клеточных зародышей с генотипом WR +/Kit^{W-Y} за счет нарушений на этапе компактизации и формирования бластоцисты. Зародыши, несущие ген +/Kit^{W-Y} развивались в основном до стадии 8-16 бластомеров (рис., а, *б*).

Наши данные показывают, что c-kit рецепторы, через которые осуществляется сигнальная регуляция раннего морфогенеза у млекопитающих, не повреждаются в присутствии ДМСО. Очевидно, эти рецепторы принимают участие в реализации криозащитных механизмов ДМСО, и нарушение их строения у мутантных зародышей может негативно влиять на жизнеспособность после криоконсервации.



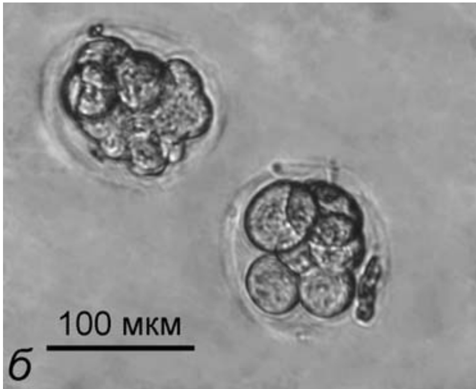


Рисунок. Морфология зародышей мыши через 72 ч культивирования *in vitro* **в среде с 1% криопротектора ДМСО:** *а)* **генотип WR +/+,** *б)* **WR +/Kit^{W-Y}**

SUMMARY

It was shown shat the development in vitro of mouse WR +/Kit^{W-Y} embryos was more effective than development of mouse B6 +/ Kit^{W-Y} embryos. It means that basic genotype is very important exposure of the same mutant gene.

The embryos carrying the mutant gene Kit^{W-Y} are less viable then the embryo with wild gene at the presence of 1% DMSO in culture medium. The abundant embryo damage of mice B6 +/Kit^{W-Y} during cryopreservation seems to be explained by a negative DMSO influence.

Литература

1. M.C. Green. Catalog of mutant genes and and polymorphic loci. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Oxford, 1989, 12-40.
2. B. Chabot, D.A. Stiphenson, V.M. Chapman et al. The protooncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. Nature, 1988, 335, 17, 88.
3. R.A. Fleischman. Human piebald trait resulting from a dominant negative mutant allel of the c-kit membrane receptor gene. J. Clin. Invest., 1992, 89, 1713-1717.
4. A. Malashenko. Yurlovo W suggested symbol W^{Y}. Mouse News Letters, 1976, 37, 61.
5. О.Л. Коломиец, Л.Ф. Курило, А.М. Малашенко и др. Изучение эффектов мутантного гена Dominant Spotting-Yurlovo (Kit $^{W-}$Y) на сперматогенез, раннее эмбриональное развитие и плодовитость мышей линии C57Bl/6 JY. Генетика, 2005, 41, 10, 1377-1386.
6. K.L. Loveland, S. Schlatt. Stem cell factor and c-kit in mammalian testis: Lessons originating from Mother's Nature's gene knockouts. J. Endocrinology, 1997, 153, 337-344.
7. О.П. Березовская, Л.М. Межевикина, Б.Н. Вепринцев. Метод культивирования ранних эмбрионов линейных мышей. Онтогенез, 1986, 17, 553-555.
8. Л.М. Межевикина, Т.В. Игнатьева, Б.Н. Вепринцев. Выживаемость эмбрионов крыс и мышей при низкотемпературной консервации. Онтогенез, 1988, 19, 491-494.
9. W.F. Dietrich, E.S. Lander, A.R. Moser et al. Genetic identification of Mom-1, a major modificier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. Cell, 1993, 75, 631-639.
10. D.W. Threadgill, A.A. Dlugosz, L.A. Hansen et al. Science, 1995, 269, 230-234.
11. З.К. Бландова, М.П. Вахрушева, А.М. Малашенко, В.В. Осипов. Spotted sterile male – новая мутация доминантной пятнистости в 5-ой хромосоме мыши. Генетика, 1986, 22, 6, 1025-1032.
12. E. Seong, T.L. Saunders, C.L. Stewart, M. Burmeister. To knockout in 129 C57Bl/6: that is the question. Trends Genet., 2004, 20, 59-62.

Г.Н. Сингина, Л.К. Эрнст, Т.Е. Тарадайник

Всероссийский Государственный научно-исследовательский институт животноводства, Академия РАСХН, Российская академия менеджмента в животноводстве (РАМЖ)

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОЛУЧЕННЫХ IN VITRO

Экстракорпоральное получение зародышей крупного рогатого скота является хорошо отработанной и рутинной технологией, широкое распространение и коммерческое использование которой во многом зависело от отработки методов замораживания. Если кратковременное хранение при плюсовых температурах только расширяет возможности манипуляций с эмбрионами, то длительное хранение в замороженном состоянии открывает возможность их транспортировки в любую точку земного шара, исключает необходимость содержания дополнительного количества реципиентов и позволяет создавать банк генетического материала высокоценных животных и исчезающих пород крупного рогатого скота.

В настоящее время в мире получено многотысячное поголовье здоровых и полноценных телят полученных после пересадки заморожено-оттаянных эмбрионов развившихся in vitro. Однако хорошо известен и тот факт, что чувствительность данных эмбрионов к процедуре охлаждения выше, а норма результативных пересадок ниже (в среднем на 10-15%), чем у in vivo аналогов. Существует достаточное количество литературы показывающей о наличии морфологических [1], ультраструктурных [2], метаболических [3] и биохимических [4] различий между этими двумя видами эмбрионов. Например, определено, что в заморожено-оттаянных эмбрионах крупного рогатого скота, полученных в результате комплексной процедуры in vitro, отмечается пониженная метаболическая активность эмбриональных клеток, уменьшение диаметра внутриклеточной массы и уровня компактизации [5, 6, 7]. Особенностью таких эмбрионов является и то, что на стадии морулы они проявляют повышенную чувствительность к замораживанию, приводящей к снижению выживаемости после про-